

10/562059

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005年1月6日 (06.01.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/000906 A1(51) 国際特許分類: C08B 37/00,
A61K 31/738, 47/10, 47/26, A61P 31/16社内 Kyoto (JP). 深江 一博 (FUKAE, Kazuhiro) [JP/JP];
〒771-0193 徳島県 徳島市 川内町加賀須野 4 6 3 大
塚化学株式会社研究技術センター内 Tokushima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/009521

(74) 代理人: 田村 巖 (TAMURA, Iwao); 〒561-0872 大阪府
豊中市 寺内 1 丁目 9 番 2 2 号 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2004年6月29日 (29.06.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-187931 2003年6月30日 (30.06.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚化学
株式会社 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP];
〒540-0021 大阪府 大阪市 中央区大手通 3 丁目 2 番
2 7 号 Osaka (JP). 三洋化成工業株式会社 (SANYO
CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒605-0995
京都府 京都市 東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 Kyoto
(JP).(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 梶原 康宏 (KAJIHARA, Yasuhiro) [JP/JP];
〒224-0014 神奈川県 横浜市 都筑区牛久保東
2-4-2-205 Kanagawa (JP).添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 前田 広景
(MAEDA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒605-0995 京都府 京都市
東山区一橋野本町 1 1 番地の 1 三洋化成工業株式2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。(54) Title: DISIALOUNDECASACCHARIDE CHAIN ASPARAGINE/FATTY ACID AMIDE AND MEDICAL DRUG CON-
TAINING THE SAME

(54) 発明の名称: ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、これを含む医薬

(57) Abstract: A disialoundecasaccharide chain asparagine/fatty acid amide; a medical drug containing the same; and a medical
drug containing disialoundecasaccharide chain asparagine.(57) 要約: ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、これを含む医薬並びにジシアロウンデカ糖鎖アスパ
ラギンを含む医薬。

WO 2005/000906 A1

明 細 書

ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、これを含む医薬

5 技術分野

本発明は、ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、これを含む組成物又は医薬に関する。

背景技術

- 10 インフルエンザは毎年のように世界中で流行している感染症で、ワクチンが存在するにもかかわらず、多くの人が毎年感染し、発熱、頭痛、筋関節痛などに悩まされる。また合併症であるインフルエンザ脳炎・脳症にかかることにより最悪の場合死に至る。ワクチンが存在するにもかかわらずインフルエンザウイルスがここまで恐れられている原因は、インフルエンザウイルスが遺伝子突然変異を起こしやすく、抗原の形が変化しワクチンによって体内に増加した抗体がそれを認識しなくなりワクチンの効き目が低下してしまうことにある。このように毎年どのような型のインフルエンザが流行するかある程度予測がついたとしても、突然
- 15 新型のウイルスが発生したりするので、適切なワクチンを迅速に供給できないことが問題となっている。そこで多種のインフルエンザウイルスに効き目があるような特効薬を開発する必要がある。近年、インフルエンザウイルスの感染機構、分子・遺伝子レベルでの解明が科学技術の飛躍的な進歩により実現でき、さまざまなインフルエンザウイルス感染阻害剤の合成が検討されている。
- 20

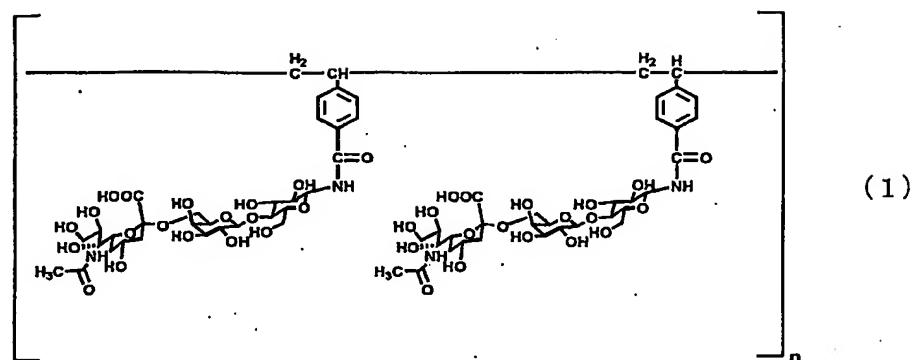
- インフルエンザウイルスの感染、増殖の機構は以下の通りである。まずウイルスが生体内に侵入し、宿主細胞に近づくとウイルス表層上のヘマグルチニンという3量体のタンパク質が宿主細胞上のレセプターであるシアリル糖鎖に特異的に
- 25
- 結合する。シアリル糖鎖は末端にシアル酸を含み、主にこのシアル酸がヘマグル

チニンとの結合に関与している。次に、ウイルスと宿主細胞の膜融合が起こり、ウイルスのRNAが宿主細胞内に流れ込み、次いでウイルス遺伝子がそこで複製され、子ウイルスが出現する。そして宿主細胞外にウイルスが出芽し増殖が完了する。ウイルスが出芽する際に、再度ヘマグルチニンとシアリル糖鎖が結合して
5 しまうが、同じウイルス表層上にあるシアリダーゼという酵素がシアリル糖鎖からシアル酸を切り離し、出芽することができる。

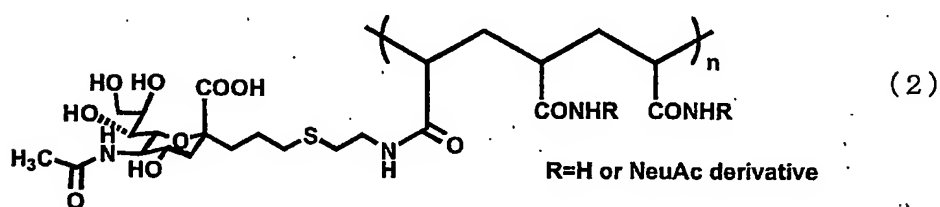
近年、このウイルス感染の最終段階で起こるシアリダーゼ反応の作用を阻害する新しい治療薬が作られた。それがザナミビル（商品名：リレンザ、グラクソ・ウエルカム社）とリン酸オセルタミビル（商品名：タミフル、日本ロシュ社）で
10 ある。しかし、この2つのシアリダーゼ阻害剤は感染の最終段階を阻害するのでウイルスの増殖がピークに達してからでは効果が少なく、発症後48時間以内の投与が望ましい。このことから、効果的な治療薬として、ウイルスが宿主細胞に結合する最初の段階を阻害するような化合物を合成することが望まれている。

ヘマグルチニン阻害剤の開発において、すでに単価性のシアリル糖鎖誘導体よりもシアリル糖鎖を分子内に複数持つ多価性シアリル糖鎖誘導体のほうがインフル
15 エンザウイルスに対して高い阻害作用を持つことが知られている。これは、ウイルス表面上に多数存在するヘマグルチニンに複数の単価性シアリル糖鎖誘導体が結合するよりも分子内に多数、シアリル糖鎖誘導体が結合した多価性分子が結合するほうが、リガンドとレセプターの親和力が増大するためである。

20 現在までに、このような効果を期待して多価性シアリル糖鎖誘導体が多数合成されている。蟹江らはシアリルラクトースを結合したスチレンポリマー（1）を合成しインフルエンザとの結合を調べたところ、シアリル糖鎖タンパク質であるフェツインに比べて1000倍強い阻害活性があることを示した。



また、Whitesides らはシアル酸誘導体を結合したポリアクリルアミドポリマー (2) を合成し高分子のポリマーであるほど阻害活性が高いことを示した。



5

しかし、高分子化合物であるポリマーは、さまざまな分子量を持つポリマーの混合物であるため構造がはっきりしない。また、もしその化合物内に 60 KDa 以上の分子量を持つものが含まれていれば、それらは分子量が大きすぎて腎臓のマルピーギ小体でボーマン嚢にろ過されず体外に排出されないため体内に残存し、

10 肝臓における代謝のバランスを崩し、人体に害を与える可能性を持っている。そのため FDA (The Food Drug Administration) は実際このようなポリマー型の化合物は有効なインフルエンザ感染阻害剤であっても安全性に問題があるとして承認していない。

本発明の目的は新規なジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド、こ

15 れを含む組成物又は医薬を提供することにある。

また本発明の目的は優れたウイルス感染及び／又は増殖阻害作用を有するインフルエンザウイルス感染症などのウイルス疾患の予防剤及び／又は治療剤を提供することにある。

発明の開示

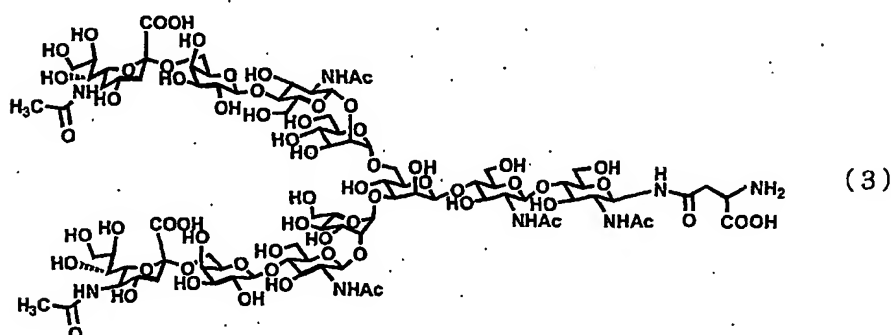
本発明は、ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドに係る。

また本発明はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドを含む組成物又は医薬に係る。

5 また本発明はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンを含む医薬に係る。

本発明のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドは、ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンと脂肪酸を反応させて得られる化合物である。

ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンは下記に示される糖鎖アスパラギン (3) である。



このジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンは、例えば特願2002-196821の参考例1に従って合成することができる。

本発明において脂肪酸アミドを構成する脂肪酸としては、炭素数6～32の脂肪族飽和もしくは脂肪族不飽和脂肪酸ならびにこれらの2種以上の併用が挙げられる。脂肪族飽和脂肪酸としては、直鎖もしくは分岐のヘキサン酸（カプロン酸、
2-エチルブタン酸等）、ヘプタン酸（エナント酸等）、オクタン酸（カプリル酸、
2-エチルヘキサン酸等）、ノナン酸（ペラルゴン酸等）、デカン酸（カプリン酸
等）、ウンデカン酸（ウンデシル酸等）、ドデカン酸（ラウリン酸、2-エチルデ
カン酸等）、トリデカン酸（トリデシル酸等）、テトラデカン酸（ミリスチン酸
20 等）、ヘキサデカン酸（パルミチン酸等）、オクタデカン酸（ステアリン酸等）、
エイコサン酸（アラキン酸等）、ドコサン酸（ベヘン酸等）、テトラコサン酸（リ

グノセリン酸等)などが挙げられる。

- 脂肪族不飽和脂肪酸としては、直鎖もしくは分岐のオクテン酸、デセン酸、ウンデセン酸（ウンデシレン酸等）、ドデセン酸、オクタデセン酸（オレイン酸、エライジン酸等）、リノール酸およびリノレン酸等が挙げられる。これらの脂肪酸のうち好ましいのは炭素数8～24、さらに好ましくは酸素数10～22の脂肪酸であり、特に好ましくはデカン酸、ドデカン酸、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸、エイコサン酸、ドコサン酸およびオクタデセン酸であり、最も好ましくは直鎖のものであって、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、アラキン酸、ベヘン酸およびオレイン酸である。

ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンと脂肪酸の反応は好ましくは反応活性化剤の存在下に反応させるのが良い。反応活性化剤としては例えばN-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBt）等を挙げることができる。

- ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンと脂肪酸の反応割合はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン1モルに対して脂肪酸を約0.1～10モル使用するのが好ましい。反応活性化剤はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン1モルに対して約0.1～10モル使用するのが好ましい。反応は通常0～80℃、好ましくは10～60℃で行うのが良く、通常約10分～5時間で終了する。
- 得られたジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドは、例えば濾過、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等で精製することができる。これら化合物の同定はNMR、HPLC（ODSカラム）でUVにおける検出時間等により行うことができる。

- 本発明のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドはジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンの親水基と、長い炭素鎖を有する脂肪酸の疎水基の両方を併せ有するため、水溶液中では図1に示すようなミセル化が容易に起こり、低分子

型で分子量、構造が明確な多価性糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

このように単価性分子のミセル化を利用すれば分子量の差異もなく、化合物を低分子に抑えられ、ポリマーよりも比較的簡単に合成できる。そしてミセル化し多価性にするることにより、例えばインフルエンザウイルスに対して極めて優れた阻害活性を示すことができる。

本発明の医薬は上記ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドを有効成分として含有するものである。また本発明の医薬はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンを有効成分として含有するものである。

本発明の医薬は、上記有効成分と製剤用添加物（担体、賦形剤など）とを含む医薬組成物の形態で提供される。担体としては、例えば、乳糖、グリセリン等を例示することができる。賦形剤としては、例えば、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等を例示することができる。医薬中の有効成分の量は約0.01～95重量%、好ましくは約1～80重量%が良い。

本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口投与または非経口投与（例えば、筋肉内投与、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与、鼻腔などへの粘膜投与、または吸入投与など）の何れでもよい。本発明の医薬の形態は特に限定されず、経口投与のための製剤としては例えば、錠剤、カプセル剤、細粒剤、粉末剤、顆粒剤、液剤、シロップ剤などが挙げられ、非経口投与のための製剤としては例えば、注射剤、点滴剤、座剤、吸入剤、経粘膜吸収剤、経皮吸収剤、点鼻剤、点耳剤などが挙げられる。

本発明の医薬の形態、使用すべき製剤用添加物、製剤の製造方法などは、いずれも当業者が適宜選択可能である。本発明の医薬の投与量は、患者の性別、年齢または体重、症状の重症度、予防または治療といった投与目的、あるいは他の合併症状の有無などを総合的に考慮して適宜選択することができる。投与量は、一般的には、 $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日～ $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日、好ましくは $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日～ $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日である。

図面の簡単な説明

第1図はジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドのミセルを示す図である。

第2図は実施例1～4の各ジシアロウンデカアスパラギン-脂肪酸アミドの化学式を示す図である。

第3図はDansyl-LacNAcのシアリル化の反応スキームを示す図である。

第4図は各阻害剤のシアル酸量を基準にしたシアリダーゼ阻害活性を示す図である。

第5図は各阻害剤のモル濃度を基準にしたシアリダーゼ阻害活性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に参考例、実施例、試験例を挙げ、本発明を具体的に説明するが、何らこれに限定されるものではない。

$^1\text{H-NMR}$ はBrukerのAVANCE 400 (400MHzと表記)で測定した。重溶媒を用いたときは溶媒ピークを基準とした。化学シフトは、 δ (ppm)で結合定数はJ (Hz)で示した。反応検出用 (以下TLC) としてはE. Merck社製DC-Platten Kieselgel 60 F254 (Art 1, 05715)を使用した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) のカラムはナカライテスク社のCOSMOSIL PACKED ODS COLUMN ($\phi 4.6 \times 150\text{mm}$)、昭和電工社製のShodex C18-5Bを使用した。分光蛍光光度計はJASCO社製のFP-210 Spectrofluorometerを用いた。

25 参考例1 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-1の合成

粗精製のSGP (シアリルグリコペプチド) (238.3mg, 80.6 μmol)

1) とアジ化ナトリウム (4.77mg, 80.8 μmol) をトリス-塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液 (TRIZUMA BASE 0.05mol/l, 塩化カルシウム 0.01mol/l, pH=7.5) 7.15ml に溶解させた。そこにアクチナーゼ-E (53.8mg) を加え、37℃で反応させた。165時間
5 後、TLCで反応終了確認後、濾過し、濾液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25, ϕ 2.5cm \times 100cm) で精製し、目的物のアスパラギンジシアロウンデカ糖1 (収量100.5mg, 収率53%) を得た。

^1H -NMR (400MHz, D_2O)

10 δ 5.22 (1H, s, Man4-H₁), 5.16 (1H, d, J=9.6Hz, GlcNAc-H₁), 5.04 (1H, s, Man4'-H₁), 4.86 (1H, s, Man3-H₁), 4.70-4.68 (3H, m, GlcNAc2-H₁, GlcNAc5,5'-H₁), 4.53 (2H, d, J=6.7Hz, Gal6,6'-H₁), 4.34 (1H, bd, Man3-H₂), 4.28 (1H, bd, Man4'-H₂),
15 n4'-H₂), 4.20 (1H, bd, Man4-H₂), 3.03 (2H, dd, J=4.2Hz, 17.2Hz, Asn- β CH), 2.95 (2H, dd, J=6.9Hz, 17.1Hz, Asn- β CH), 2.76 (2H, dd, J=4.6Hz, 12.4Hz, NeuAc7,7'-H_{3eq}), 2.14 (18H, s \times 6, -Ac), 1.80 (2H, dd, J=12.2Hz, 12.1Hz, NeuAc7,7'-H3ax)
20

実施例1 ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-デカン酸アミド3の合成

デカン酸 (22mg, 127.6 μmol) をジメチルホルムアミド1ml に溶かし、そこにジシクロヘキシルカルボジイミド (23.9mg, 115.8 μmol) とN-ヒドロキシスクシンイミド (13.4mg, 116.4 μmol) を
25 加え、室温で反応させた。6時間後、濾過し、濾液を濃縮し残留物 (デカン酸スクシンイミド体) を取り出した。次にアスパラギンジシアロウンデカ糖1 (10.

0 mg, 4.27 μ mol) を水 0.8 ml に溶かし、そこに炭酸水素ナトリウム (1.4 mg, 16.7 μ mol) を加えた。そこにアセトン 1.2 ml に溶かし、
 180 分後 TLC で原料消失を確認し溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残
 留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25 ϕ 1.0 cm \times 20 cm) で精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、高速液体クロマトグラ
 フィー (ODS カラム ϕ 4.6 \times 150 mm 展開溶媒はグラジエント 60
 分で水 100% \rightarrow アセトニトリル 100% 流速 1.0 ml/min) で精製し、
 目的物のデカン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 3 (収量 7.7 mg, 収率
 72%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O)

δ 5.23 (1H, s, Man4- H_1), 5.12 (1H, d, $J=9.6$ Hz, GlcNAc- H_1), 5.04 (1H, s, Man4'- H_1), 4.87 (1H, s, Man3- H_1), 4.71-4.69 (3H, m, GlcNAc2- H_1 , GlcNAc5,5'- H_1), 4.59 (1H, dd, $J=4.5$ Hz, 8.0 Hz, Asn- αCH), 4.53 (2H, d, $J=7.9$ Hz, Gal6,6'- H_1), 4.34 (1H, bd, Man3- H_2), 4.29 (1H, bd, Man4'- H_2), 4.21 (1H, bd, Man4- H_2), 2.88 (2H, dd, $J=4.4$ Hz, 15.5 Hz, Asn- βCH), 2.78-2.70 (3H, m, NeuAc7,7'- H_{seq} , Asn- βCH), 2.34 (2H, t, $J=7.4$ Hz, COCH_2), 2.14 (18H, s \times 6, -Ac), 1.80 (2H, dd, $J=12.2$ Hz, 12.0 Hz, NeuAc7,7'- H_{sax}), 1.71-1.60 (2H, m, CH_2), 1.42-1.30 (12H, m, CH_2), 0.95 (3H, t, $J=6.5$ Hz, CH_3)

25 実施例2 ジシアロウンデカアスパラギン-ミリスチン酸アミド4の合成

ミリスチン酸 (22.0 mg, 96.3 μ mol) をジメチルホルムアミド 1 ml

1に溶かし、そこにジシクロヘキシルカルボジイミド (18.2mg, 88.2 μ mol) とN-ヒドロキシベンゾトリアゾール (11.9mg, 96.7 μ mol) を加え、室温で反応させた。6時間後、濾過し、濾液を濃縮し残留物 (ミリスチン酸ベンゾトリアゾール体) を取り出した。次にアスパラギンジシアロウンデカ糖1 (6mg, 2.57 μ mol) を水0.8mlに溶かし、そこに炭酸水素ナトリウム (0.86mg, 10.3 μ mol) を加えた。そこにアセトン1.2mlに溶かしたミリスチン酸ベンゾトリアゾール体 (2.8mg, 7.70 μ mol) を加え室温で攪拌した。180分後TLCで原料消失を確認し溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25 ϕ 1.0cm \times 20cm) で精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、高速液体クロマトグラフィー (ODSカラム ϕ 4.6 \times 150mm 展開溶媒はグラジエント60分で水100% \rightarrow アセトニトリル100%流速1.0ml/min) で精製し、目的物のミリスチン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖4 (収量5.3mg, 収率81%) を得た。

15 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, D_2O)

δ 5.23 (1H, s, Man4- H_1), 5.12 (1H, d, $J=9.6\text{Hz}$, GlcNAc- H_1), 5.04 (1H, s, Man4'- H_1), 4.87 (1H, s, Man3- H_1), 4.70-4.69 (3H, m, GlcNAc2- H_1 , GlcNAc5,5'- H_1), 4.59 (1H, dd, $J=4.6\text{Hz}$, 8.1Hz, Asn- αCH), 4.54 (2H, d, $J=7.8\text{Hz}$, Gal6,6'- H_1), 4.34 (1H, bd, Man3- H_2), 4.29 (1H, bd, Man4'- H_2), 4.20 (1H, bd, Man4- H_2), 2.88 (2H, dd, $J=4.6\text{Hz}$, 15.6Hz, Asn- βCH), 2.83-2.70 (3H, m, NeuAc7,7'- H_{3eq} , Asn- βCH), 2.34 (2H, t, $J=7.4\text{Hz}$, C-OCH_2), 2.14 (18H, s \times 6, -Ac), 1.80 (2H, dd, $J=12.1\text{Hz}$, 12.1Hz, NeuAc7,7'- H_{3ax}), 1.71-1.60 (2

H, m, CH₂), 1.42–1.30 (20H, m, CH₂), 0.95 (3H, t, J = 6.5 Hz, CH₃)

実施例3 ジシアロウンデカアスパラギンーステアリン酸アミド5の合成

ステアリン酸 (22.0 mg, 77.3 μmol) をジメチルホルムアミド 1 ml に溶かし、そこにジシクロヘキシルカルボジイミド (14.4 mg, 69.8 μmol) と N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (9.5 mg, 77.2 μmol) を加え、室温で反応させた。6 時間後、濾過し、濾液を濃縮し残留物 (ステアリン酸ベンゾトリアゾール体) を取り出した。次にアスパラギンジシアロウンデカ糖 1 (8.0 mg, 3.36 μmol) を水 1.2 ml に溶かし、そこに炭酸水素ナトリウム (3.2 mg, 38.1 μmol) を加えた。そこにアセトン 1.8 ml に溶かしたステアリン酸ベンゾトリアゾール体 (8.8 mg, 20.2 μmol) を加え 37℃ で攪拌した。195 分後 TLC で反応終了を確認し溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25 φ1.0 cm×20 cm) で精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、高速液体クロマトグラフィー (ODS カラム φ4.6×150 mm 展開溶媒はグラジエント 60 分で水 100%→アセトニトリル 100% 流速 1.0 ml/min) で精製し、目的物のステアリン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 5 (収量 6.2 mg, 収率 69%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

δ 5.23 (1H, s, Man4-H₁), 5.12 (1H, d, J = 9.5 Hz, GlcNAc-H₁), 5.04 (1H, s, Man4'-H₁), 4.86 (1H, s, Man3-H₁), 4.71–4.69 (3H, m, GlcNAc2-H₁, GlcNAc5,5'-H₁), 4.59 (1H, dd, J = 4.6 Hz, 8.2 Hz, Asn-αCH), 4.54 (2H, d, J = 7.8 Hz, Gal6,6'-H₁), 4.34 (1H, bd, Man3-H₂), 4.29 (1H, bd, Man4'-H₂), 4.20 (1H, bd, Man4-H₂), 2.88 (2H, dd, J = 4.7

Hz, 15.5 Hz, Asn- β CH), 2.78-2.70 (3H, m, NeuAc 7,7'-H_{3eq}, Asn- β CH), 2.34 (2H, t, J=7.3 Hz, COCH₂), 2.16 (18H, s \times 6, -Ac), 1.80 (2H, dd, J=12.1 Hz, 12.1 Hz, NeuAc 7,7'-H_{3ax}), 1.71-1.60 (2
 5 H, m, CH₂), 1.42-1.30 (28H, m, CH₂), 0.96 (3H, t, J=6.7 Hz, CH₃)

実施例4 ジシアロウンデカアスパラギン-ベヘン酸アミド6の合成

ベヘン酸 (20.0 mg, 58.7 μ mol) をジメチルホルムアミド 3 ml に溶かし、そこにジシクロヘキシルカルボジイミド (10.3 mg, 50.0 μ mol) と N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (6.8 mg, 50.3 μ mol) を加え、室温で反応させた。19 時間後、濾過し、濾液を濃縮し残留物 (ベヘン酸ベンゾトリアゾール体) を取り出した。次にアスパラギンジシアロウンデカ糖 1 (5 mg, 2.1 μ mol) を水 1.2 ml に溶かし、そこに炭酸水素ナトリウム (2.0 mg, 21.0 μ mol) を加えた。そこにアセトン 1.8 ml に溶かし
 15 たベヘン酸ベンゾトリアゾール体 (8.8 mg, 18.9 μ mol) を加え 37℃ で攪拌した。20 時間後 TLC で反応終了を確認し溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (sephadex G-25 ϕ 1.0 cm \times 20 cm) で精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥後、高速液体クロマトグラフィー (ODS カラム ϕ 4.6 \times 150 mm 展開溶媒はグラジエント
 20 ト 60 分で水 100% \rightarrow アセトニトリル 100% 流速 1.0 ml/min) で精製し、目的物のベヘン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 6 (収量 3.24 mg, 収率 57%) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, D₂O)

δ 5.23 (1H, s, Man4-H₁), 5.12 (1H, d, J=9.2 Hz, GlcNAc-H₁), 5.04 (1H, s, Man4'-H₁), 4.86 (1H, s, Man3-H₁), 4.70-4.69 (3H, m, GlcNAc2-H₁ G

1 cNAc 5, 5'-H₁), 4.59 (1H, dd, J=4.5Hz, 8.0Hz, Asn-αCH), 4.54 (2H, d, J=7.4Hz, Gal 6, 6'-H₁), 4.34 (1H, bd, Man 3'-H₂), 4.29 (1H, bd, Man 4'-H₂), 4.21 (1H, bd, Man 4-H₂), 2.88 (2H, dd, J=4.4 Hz, 16.4Hz, Asn-βCH), 2.78-2.70 (3H, m, NeuAc 7, 7'-H_{3eq}, Asn-βCH), 2.35 (2H, t, J=7.3Hz, COCH₂), 2.13 (18H, s×6, -Ac), 1.80 (2H, dd, J=1 2.1Hz, 12.0Hz, NeuAc 7, 7'-H_{3ax}), 1.71-1.60 (2H, m, CH₂), 1.42-1.30 (36H, m, CH₂), 0.95 (3H, 10 t, J=6.6Hz, CH₃)

上記実施例1～4の各ジシアロウンデカアスパラギン-脂肪酸アミドの化学式を図2に示す。

試験例1

インフルエンザウイルス感染阻害剤のシアリダーゼ阻害活性の測定

15 (1) 蛍光標識したN-アセチルラクトサミン誘導体のシアリル化

ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドが水溶液中で実際にミセル化するかどうかを調べた。そこで蛍光標識したシアリル糖鎖に対するシアリダーゼ阻害活性を測定し、I C₅₀を求めた。もし、蛍光標識したシアリル糖鎖7に対してジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン1及び、合成した4つの糖脂質誘導体をそれぞれ共存させシアリダーゼ阻害活性を測定し、炭素鎖の長さに依存して阻害活性が増加すればそれはミセル化の効果と考えられる。まず蛍光標識したシアリル糖鎖を合成した。蛍光標識にはDansyl基を使用した。N-アセチルラクトサミン誘導体をDansyl標識した6-[(N-Dansyl) amino]-hexyl-O-β-D-galactopyranosyl-(1→ 20 4)-2-acetoamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (以後Dansyl-LacNAcと表記する)を合成し、それ

に α (2, 6) シアリルトランスフェラーゼを用いてガラクトースにシアル酸を転移させDansyl 標識したシアリル糖鎖 (以後NeuAc-LacNAc-Dansyl と表記する) を合成した。

Dansyl-LacNAc、CMP-シアル酸、 α (2, 6) シアリルトランスフェラーゼ、アルカリンホスファターゼ、牛血清アルブミンをカコジル酸緩衝溶液 (pH 6.0, 50 mM) に溶かし 37℃ で 65 時間反応させ、高速液体クロマトグラフィーで精製し、NeuAc-LacNAc-Dansyl 7 を 69 % の収率で得ることができた。化合物 7 の¹H NMR を測定したところ、シアル酸に特有のピークである 3 位のエキソアリアル、アキシアルのプロトンピークが 2.74 ppm、1.80 ppm に確認できた。また、原料の Dansyl-LacNAc の¹H NMR と比較したところ 7 のガラクトースの 1 位のプロトンピークが原料のピークに比べて高磁場にシフトしていたのでガラクトース 6 位にシアル酸が結合していることがわかった。このようにして化合物 7 を同定した。上記反応を図 3 に示す。

15 (2) ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドのシアリダーゼ阻害活性測定

NeuAc-LacNAc-Dansyl をシアリダーゼにより加水分解させる実験に、合成した糖脂質誘導体 3, 4, 5, 6 及びシアリルラクトース、ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン 1 を阻害剤として加えそれぞれに対して IC₅₀ を求めた。反応条件は以下の通りである。100 μ M の NeuAc-LacNAc-Dansyl にそれぞれの阻害剤を 10 μ M、100 μ M、300 μ M の 3 つの条件で加え (溶媒は牛血清アルブミンを溶かした HEPES 緩衝溶液)、そこにシアリダーゼを加えて 37℃ で 30 分間インキュベートした。そして蛍光標識した NeuAc-LacNAc-Dansyl の分解率を高速液体クロマトグラフィーにより定量し、その結果から IC₅₀ を算出した。そしてその結果を基質別にグラフにまとめた。これらのグラフの縦軸は酵素反応を 50 % 阻害するた

めに必要な阻害剤の濃度（IC₅₀）である。図4のグラフは系内のシアル酸量に対してIC₅₀を求めたものである。アスパラギンジシアロウンデカ糖は分子内に2つシアル酸を含んでいるのでシアル酸の量に対してIC₅₀を求める実測値を2倍した。図4のようになる。

- 5 インヒビター自体のモル濃度に対して実測したIC₅₀を求めるとシアリルラクトース以外のインヒビターのIC₅₀は、図4の値の半分になる（図5）。図4のグラフから、一番炭素鎖の短いデカン酸が疎水基としてアスパラギンジシアロウンデカ糖1に結合するだけでIC₅₀の値が、疎水基の結合していないジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン1の値の4分の3になることがわかった。これは
- 10 親水基であるジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンに疎水基のカルボン酸が結合することによりその化合物がミセル化し、1つの分子内に多くのジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンを含むために、シアリダーゼに囚われる頻度が上昇し、NeuAc-LacNAc-Dansylのシアル酸除去が阻害される力が高まるためと考えられる。また疎水基の炭素鎖が長くなるほど（デカン酸→ミリスチン酸→
- 15 ステアリン酸→ベヘン酸）IC₅₀の値が系統的に小さくなることが判明した。これは疎水基の炭素鎖が長くなるほどミセル体の表面積が上昇し、その分子表面内に含まれるジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンの数が上昇するためにNeuAc-LacNAc-Dansylのシアル酸の加水分解を阻害する能力が高まったものと考えられる。また、図5から、分子内のシアリルラクト系が1つ増える
- 20 だけで、シアリダーゼに対する阻害活性が高まり、さらに炭素鎖の長いほどその効果がより強くなることがわかった。

（3）ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドのインフルエンザウイルス阻害活性測定

- 実施例1～4のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド（図2の誘導体3, 4, 5, 6）を阻害剤として加えそれぞれに対してをインフルエンザウイルス（ヘマグルチニン）阻害活性求めた。反応条件は以下の通りである。
- 25

使用したインフルエンザウイルスは、A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) を使用した。

鶏受精卵に接種し、しょう尿膜液を採取し超遠心精製、ホルマリン不活化したものを精製ウイルス抗原として使用した。これをエーテル処理してHA（ヘマグルチニン）分画を集めたものをHA split分画とした。

- 1) 上記図2の誘導体3, 4, 5, 6の各2mgをPBS 1mlに溶解した。
- 2) サンプルを原液、2倍、4倍、8倍にPBSで希釈した。
- 3) 96穴 U プレート（三光純薬）にサンプル各10 μ lとウイルス希釈液40 μ lを混和した。
- 10 4) 4℃ 60分 静置した。
- 5) mixtureに50 μ l PBSを加えて50 μ lの2倍階段希釈を作る。
- 6) ニワトリ赤血球（日本バイオテスト研究所）を0.5%になるように調整する。
- 7) 各wellに血球浮遊液50 μ lを加えて混和し4℃、60分静置した。
- 15 8) インフルエンザウイルス（ヘマグルチニン）阻害活性を測定した結果、誘導体3：190.0 μ mol、誘導体4：95.0 μ mol、誘導体5：47.5 μ mol、誘導体6：37.5 μ molで阻害活性を示した。

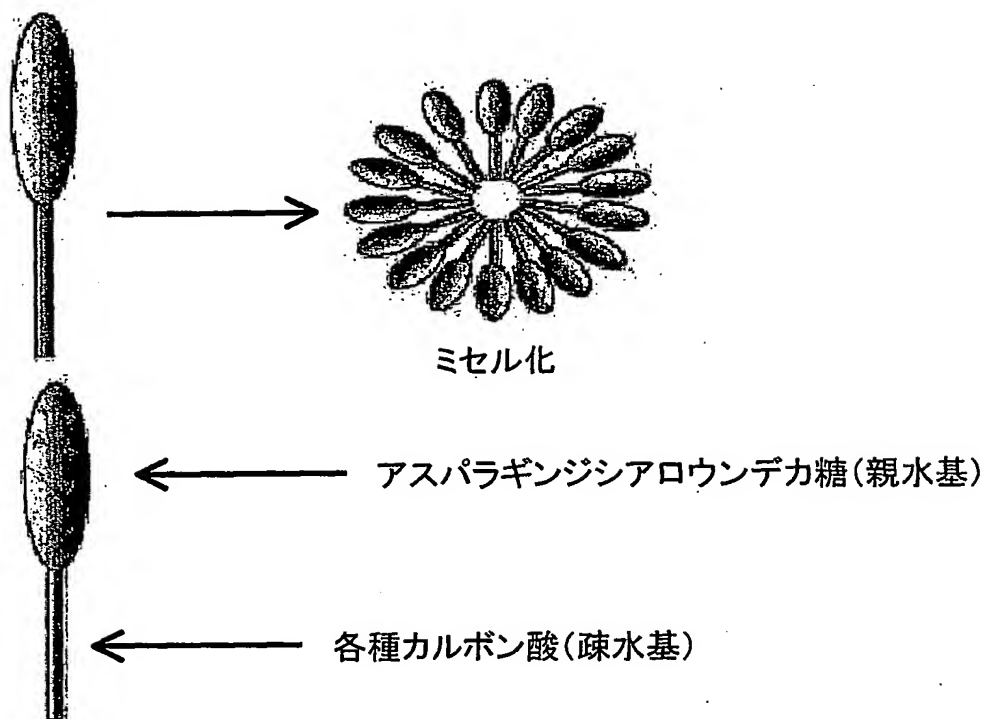
産業上の利用可能性

- 20 本発明のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド並びにジシアロウンデカ糖鎖アスパラギンは、特に優れたウイルス感染及び／又は増殖阻害作用を有し、例えばインフルエンザウイルス感染症などのウイルス疾患の予防剤及び／又は治療剤として優れた効果を奏する。

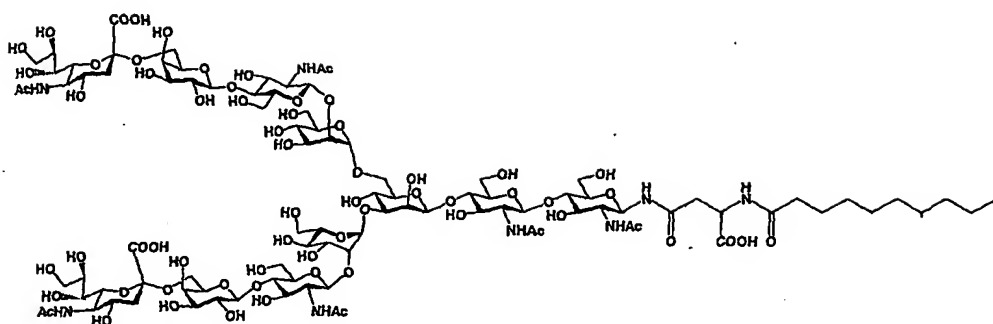
請求の範囲

1. ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド。
2. 脂肪酸が炭素数 8 ～ 24 の脂肪酸である請求の範囲第 1 項に記載のジシア
5 ロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド。
3. 脂肪酸が炭素数 10 ～ 22 の脂肪酸である請求の範囲第 2 項に記載のジシア
アロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド。
4. 脂肪酸がカプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステア
リン酸、アラキン酸、ベヘン酸およびオレイン酸からなる群から選ばれる 1 種以
10 上である請求の範囲第 3 項に記載のジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸
アミド。
5. 請求の範囲第 1 ～ 4 項のいずれか 1 項に記載のジシアロウンデカ糖鎖アス
パラギン-脂肪酸アミドならびに製剤用添加物からなる組成物。
6. 製剤用添加物が乳糖、グリセリン、ブドウ糖、ショ糖およびマンニトール
15 からなる群から選ばれる 1 種以上の添加物である請求の範囲第 5 項記載の組成物。
7. ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミドを含む医薬。
8. ジシアロウンデカ糖鎖アスパラギン-脂肪酸アミド及びジシアロウンデカ
糖鎖アスパラギンから選ばれる 1 種以上ならびに製剤用添加物からなる医薬。
9. ウイルス疾患の予防剤及び／又は治療剤である請求の範囲第 7 項または第
20 8 項記載の医薬。
10. インフルエンザウイルス感染症の予防剤及び／又は治療剤である請求の範
囲第 7 ～ 9 項のいずれか 1 項に記載の医薬。

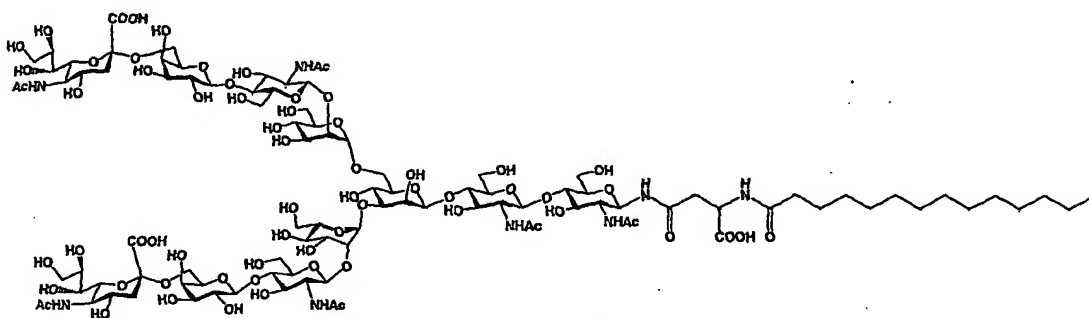
第 1 図



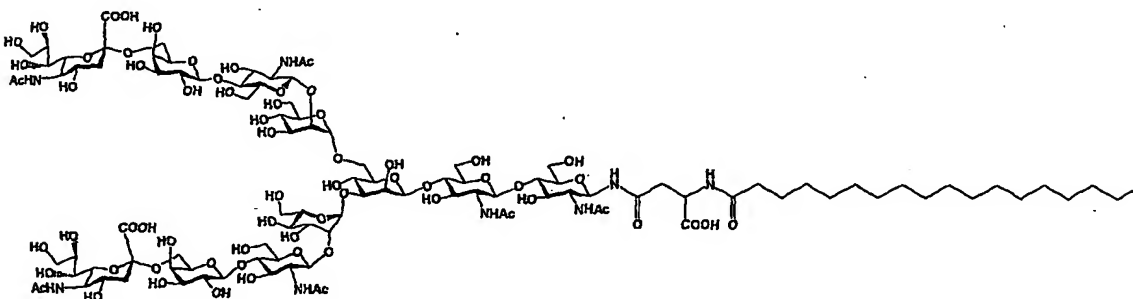
第 2 図



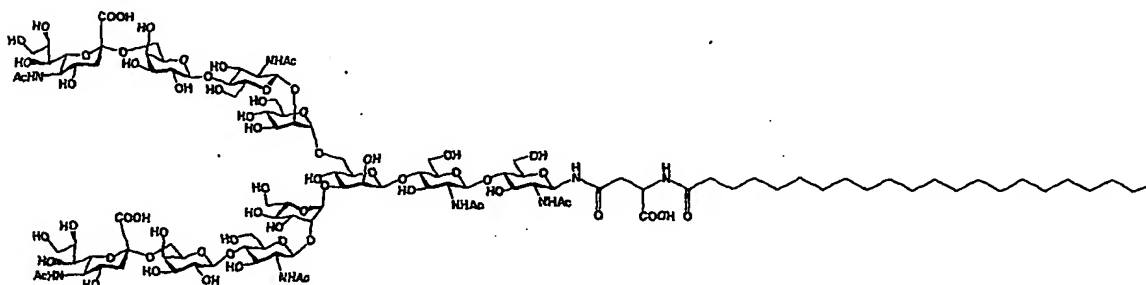
デカン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 3



ミリスチン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 4

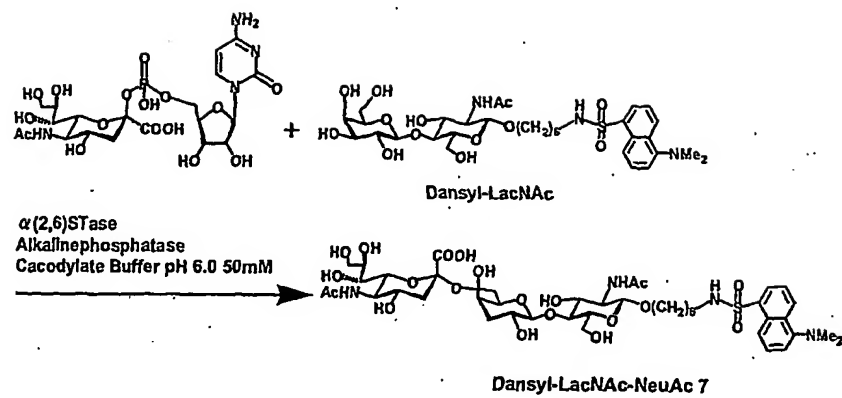


ステアリン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 5



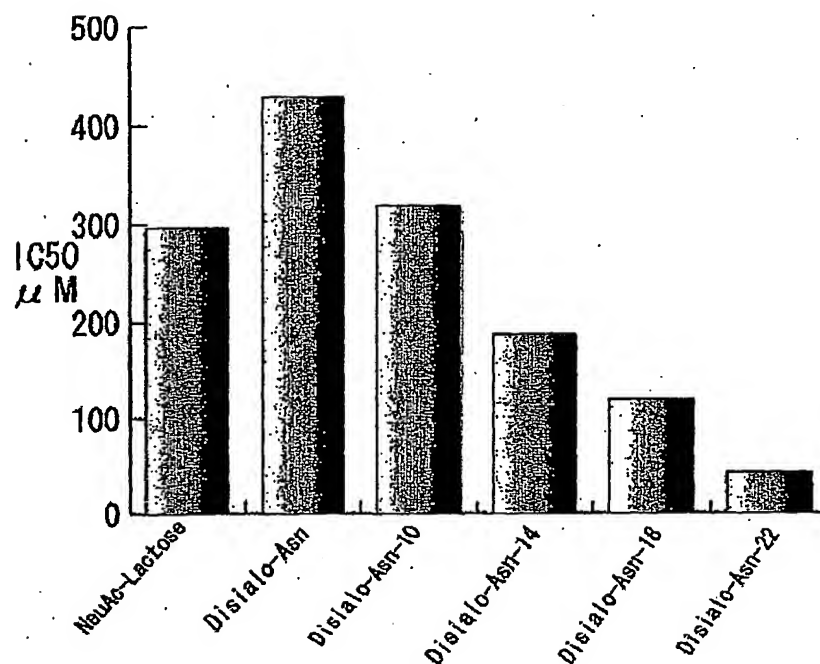
ペヘン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 6

第 3 図



第 4 図

Dansyl-LacNAc-NeuAc に対する各阻害剤のシアリダーゼ阻害活性
(各阻害剤のシアル酸量を基準にした IC50)



略称

NeuAc-Lactose : シアリルラクトース

Disialo-Asn : アスパラギンジシアロウンデカ糖 1

Disialo-Asn-10 : デカン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 3

Disialo-Asn-14 : ミリスチン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 4

Disialo-Asn-18 : ステアリン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 5

Disialo-Asn-22 : ペヘン酸-アスパラギンジシアロウンデカ糖 6

各阻害剤の IC50 の値

NeuAc-Lactose : 295.5 μM

Disialo-Asn : 428.3 μM

Disialo-Asn-10 : 318.5 μM

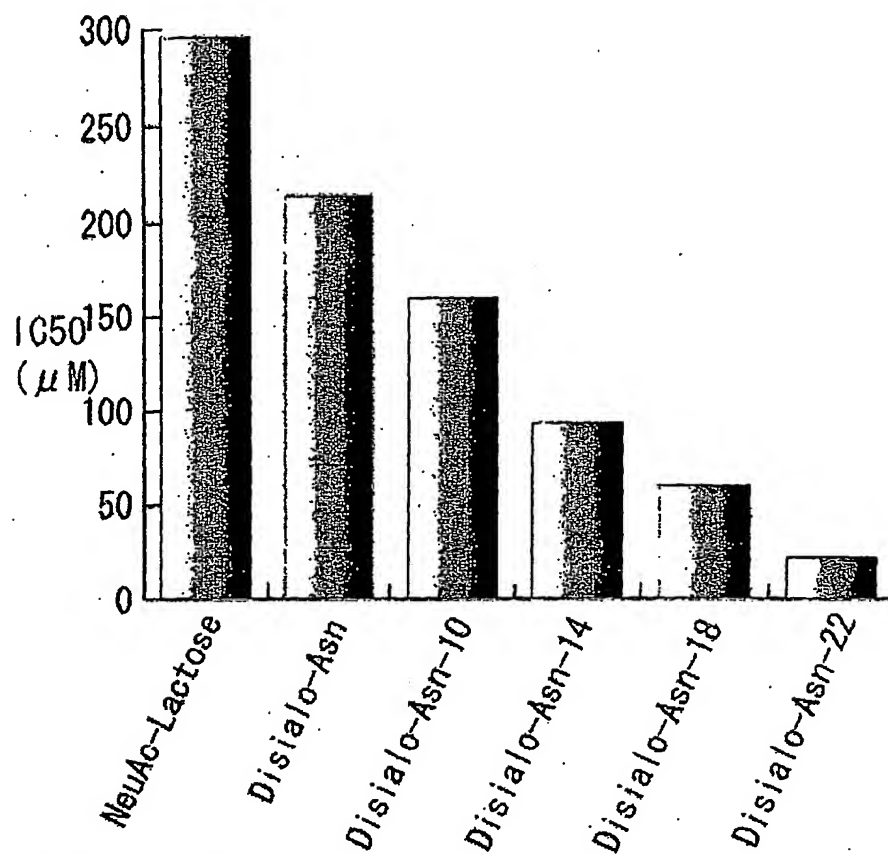
Disialo-Asn-14 : 186.4 μM

Disialo-Asn-18 : 117.9 μM

Disialo-Asn-22 : 42.9 μM

第 5 図

Dansyl-LacNAc-NeuAc に対する各阻害剤のシアリダーゼ阻害活性
(阻害剤のモル濃度を基準にした IC₅₀)



各阻害剤の IC₅₀ の値

NeuAc-Lactose : 295.5 μM	Disialo-Asn-14 : 93.2 μM
Disialo-Asn : 214.2 μM	Disialo-Asn-18 : 58.9 μM
Disialo-Asn-10 : 79.6 μM	Disialo-Asn-22 : 21.5 μM

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C08B37/00, A61K31/738, 47/10, 47/26, A61P31/16														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C08B37/00, A61K31/738, 47/10, 47/26, A61P31/16														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN)														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>P, A</td> <td>WO 2004/058824 A1 (Otsuka Chemical Co., Ltd.), 15 July, 2004 (15.07.04), Claim 1 (Family: none)</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2003-128703 A (Yasuhiro KAJIWARA), 08 May, 2003 (08.05.03), Claim 3 & WO 03/008431 A1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>LOWE, Mark et al., The structure of the complex type oligosaccharide from rabbit hepatic binding protein, The Journal of Biological Chemistry, Vol.258, No.3, 1885-1887, 1993, abstract</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	P, A	WO 2004/058824 A1 (Otsuka Chemical Co., Ltd.), 15 July, 2004 (15.07.04), Claim 1 (Family: none)	1-10	A	JP 2003-128703 A (Yasuhiro KAJIWARA), 08 May, 2003 (08.05.03), Claim 3 & WO 03/008431 A1	1-10	A	LOWE, Mark et al., The structure of the complex type oligosaccharide from rabbit hepatic binding protein, The Journal of Biological Chemistry, Vol.258, No.3, 1885-1887, 1993, abstract	1-10
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
P, A	WO 2004/058824 A1 (Otsuka Chemical Co., Ltd.), 15 July, 2004 (15.07.04), Claim 1 (Family: none)	1-10												
A	JP 2003-128703 A (Yasuhiro KAJIWARA), 08 May, 2003 (08.05.03), Claim 3 & WO 03/008431 A1	1-10												
A	LOWE, Mark et al., The structure of the complex type oligosaccharide from rabbit hepatic binding protein, The Journal of Biological Chemistry, Vol.258, No.3, 1885-1887, 1993, abstract	1-10												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 08 September, 2004 (08.09.04)		Date of mailing of the international search report 28 September, 2004 (28.09.04)												
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer												
Facsimile No.		Telephone No.												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009521

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ENDO, Masahiko et al., The structure and microheterogeneity of the carbohydrate chains of human plasma ceruloplasmin, The Journal of Biological Chemistry, Vol.257, No.15, pages 8755 to 8760, 1982, abstract	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C08B37/00, A61K31/738, 47/10, 47/26, A61P31/16		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C08B37/00, A61K31/738, 47/10, 47/26, A61P31/16		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	WO 2004/058824 A1 (大塚化学株式会社) 2004.07.15, クレーム1 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2003-128703 A (梶原 康宏) 2003.05.08, 請求項3 & WO 03/008431 A1	1-10
A	LOWE, Mark et al., The structure of the complex type oligosaccharide from rabbit hepatic binding protein, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 258, No.3, 1885-1887, 1993, abstract	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 08.09.2004	国際調査報告の発送日 28.9.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田名部 拓也	4P 9738
電話番号 03-3581-1101 内線 3492		

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	ENDO, Masahiko et al., The structure and microheterogeneity of the carbohydrate chains of human plasma ceruloplasmin, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 257, No.15, pp.8755-8760, 1982, abstract	1-10